

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002477

International filing date: 08 March 2005 (08.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: CH
Number: 00144/05
Filing date: 01 February 2005 (01.02.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 20 April 2005 (20.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



PCT/EP200 5 / 0 0 2 4 7 7

11.07.05

**SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
CONFÉDÉRATION SUISSE
CONFEDERAZIONE SVIZZERA**

Bescheinigung

Die beiliegenden Akten stimmen mit den ursprünglichen technischen Unterlagen des auf der nächsten Seite bezeichneten Patentgesuches für die Schweiz und Liechtenstein überein. Die Schweiz und das Fürstentum Liechtenstein bilden ein einheitliches Schutzgebiet. Der Schutz kann deshalb nur für beide Länder gemeinsam beantragt werden.

Attestation

Les documents ci-joints sont conformes aux pièces techniques originales de la demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein spécifiée à la page suivante. La Suisse et la Principauté de Liechtenstein constituent un territoire unitaire de protection. La protection ne peut donc être revendiquée que pour l'ensemble des deux Etats.

Attestazione

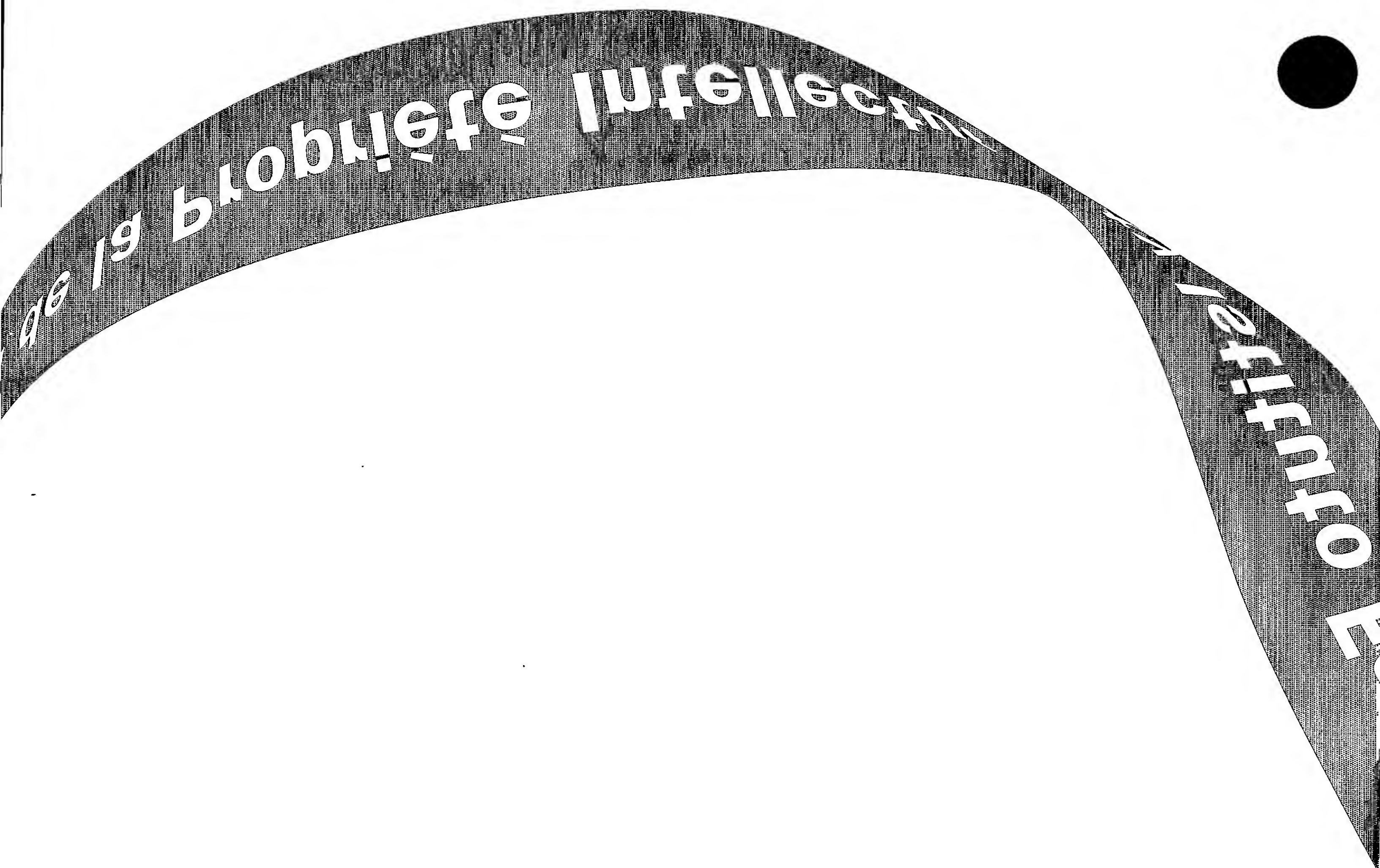
I documenti allegati sono conformi agli atti tecnici originali della domanda di brevetto per la Svizzera e il Liechtenstein specificata nella pagina seguente. La Svizzera e il Principato di Liechtenstein formano un unico territorio di protezione. La protezione può dunque essere rivendicata solamente per l'insieme dei due Stati.

Bern, 4. APR. 2005

Eidgenössisches Institut für Geistiges Eigentum
Institut Fédéral de la Propriété Intellectuelle
Istituto Federale della Proprietà Intellettuale

Administration Patente
Administration des brevets
Amministrazione dei brevetti


Jenni Heinz



de la Proprietate Intellectuala

Institutul

Certificato di deposito per la domanda di brevetto no 00144/05 (Art. 46 cpv. 5 OBI)

L'Istituto Federale della Proprietà Intellettuale accusa ricevuta della domanda di brevetto svizzero specificata in basso.

Titolo:

Composizione cosmetica per l'applicazione cutanea idonea a distendere le rughe d'espressione.

Richiedente:

LABO COSPROPHAR AG
Aeschengraben 9
4051 Basel

Mandatario:

Ammann Patentanwälte AG Bern
Schwarztorstrasse 31
3001 Bern

Data di deposito: 01.02.2005

Classificazione provvisoria: A61K

Cambiamento della sede sociale:

Labo Cosprophar AG
Gartenstrasse 22
4052 Basel
(titolare)

reg: 23.02.2005



DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce ad una composizione cosmetica per l'applicazione cutanea idonea a distendere le rughe d'espressione.

Le rughe facciali sono notoriamente solchi ad andamento più o meno lineare presenti sulla cute del viso, di profondità variabile, che vengono considerati come un segno dell'invecchiamento della pelle.

Le cause che determinano la formazione delle rughe sono da ascrivere principalmente all'azione combinata dei seguenti fattori:

i) invecchiamento cutaneo cronologico nel suo complesso, ii) forza di gravità, iii) degradazione delle fibre elastiche e collageniche per azione della luce solare; iv) conseguenza di ripetuti movimenti muscolari ed articolari.

Questi fattori incidono in maniera diversa nella formazione della ruga a seconda che si tratti di rughe da invecchiamento, rughe gravitazionali, rughe attiniche o rughe di espressione.

Le rughe da invecchiamento si formano in seguito alla riduzione dello spessore del derma e alla diminuzione del numero di fibroblasti presenti, nonché al rallentamento del turnover cellulare e del metabolismo cellulare stesso.

Le rughe gravitazionali compaiono quando le fibre elastiche e i fasci di collagene alterati del derma non sono più in grado di controbilanciare la forza di gravità e compaiono fisiologicamente nel processo di invecchiamento dell'organismo.

Le rughe attiniche sono dovute al danno cumulativo esercitato dalla radiazione solare sulle fibre elastiche e collagene. Sono presenti nelle

nelle regioni fotoesposte. Corrispondono ad una più o meno marcata accentuazione della tramatura cutanea che determina un quadro di sottili rughe diffuse.

Le rughe di espressione o muscolo mimiche sono quei solchi che si formano sulla cute del volto essenzialmente a causa della trazione ripetitiva esercitata dai muscoli mimici.

All'età di 30 anni le rughe di espressione sono già ben visibili ma con il progredire dell'età diventano progressivamente più profonde. Sono da considerarsi come rughe dinamiche, quindi in diretta relazione all'energia contrattiva muscolare e al numero di contrazioni. Queste rughe sono più evidenti nei soggetti che fanno largo uso della mimica facciale, sono più marcate in alcune sedi ad elevato dinamismo del volto come intorno alla bocca o agli occhi, nella fronte per il corrugamento o dal lato più usato per l'espressione.

Per meglio comprendere la loro natura ed origine è importante rilevare come i muscoli mimici facciali abbiano rapporto con il contorno delle orbite, le palpebre, il naso, le labbra, le guance, la bocca, il padiglione auricolare, il cuoio capelluto e la cute del collo. I muscoli mimici del volto sono piccoli e sottili, hanno in comune il fatto di avere una terminazione nervosa cutanea e possono essere elevatori, depressori, costrittori o dilatatori. Il loro ruolo è duplice: funzionale e di esteriorizzazione delle funzioni mentali dell'individuo. Quasi tutti si trovano nel connettivo sottocutaneo della parte anteriore del viso. Dalla loro inserzione profonda nel piano osseo della faccia, si portano in superficie verso la pelle, dove, a livello dello strato dermico profondo, presentano la loro inserzione superficiale. La loro contrazione determina lo spostamento della cute del viso, con la formazione di pieghe, che sono sempre perpendicolari alla direzione delle fibre muscolari. Queste pieghe determinano una mo-

determinano una modificazione dei tratti del volto, che è peculiare di quel determinato muscolo e possono considerarsi come un'espressione dinamica della personalità, del carattere o di un particolare stato d'animo.

I muscoli facciali, come tutti i tessuti muscolari, sono formati da fibre muscolari (ogni fibra muscolare è una singola cellula muscolare) formate da centinaia di lunghi fascetti contrattili detti miofibrille a loro volta costituite da filamenti contrattili. Le fibre nervose innervano le fibre muscolari attraverso delle ramificazioni terminanti in rigonfiamenti detti bottoni sinaptici. Quando lo stimolo nervoso, che induce la contrazione, raggiunge l'estremità della fibra nervosa, a livello del bottone sinaptico si verifica l'accumulo di numerosissime vescicole contenenti all'interno il neurotrasmettitore acetilcolina che, in seguito alla fusione delle vescicole stesse con la membrana del neurone, viene liberato in grandi quantità a livello dello spazio che intercorre tra il bottone sinaptico e la fibra muscolare (spazio sinaptico).

Le molecole di acetilcolina, una volta liberate, si legano a specifici recettori, ovvero proteine canale che attraversano, per l'intero spessore, la membrana plasmatica della cellula muscolare. Generalmente questi recettori canale sono chiusi, e tali rimangono fin tanto che alcune molecole di acetilcolina non si legano ad essi portandone all'apertura. Con l'apertura di questi canali recettori dell'acetilcolina si verifica, complessivamente, il passaggio di grandi quantità di ioni positivi (ioni sodio Na^+) all'interno della cellula muscolare. Tale flusso di ioni Na^+ provoca un'inversione di polarità della membrana plasmatica muscolare: la cosiddetta depolarizzazione della membrana che porta all'insorgenza di un potenziale d'azione. Una volta insorto, il potenziale d'azione si propaga da dove è stato applicato lo stimolo alla zona di membrana successiva, causando la sua depolarizzazione.

Il potenziale d'azione induce la liberazione, nel citoplasma della cellula, degli ioni calcio Ca^{2+} da parte del reticolo endoplasmatico, organo presente all'interno della cellula muscolare che contiene grandi concentrazioni di ioni calcio. La loro liberazione avviene in seguito all'apertura dei canali voltaggio-dipendenti presenti nella membrana del reticolo che, sotto l'effetto del potenziale d'azione, si aprono facendo fuoriuscire gli ioni calcio. A questo punto quando il calcio viene rilasciato nel citoplasma della cellula muscolare tutti i filamenti contrattili presenti in essa vengono rapidamente attivati portando alla contrazione del muscolo. Il calcio quindi funge così da vero e proprio interruttore in grado di innescare la contrazione muscolare.

Alcuni recenti trattamenti anti- rughe si basano proprio sulla interazione con i sistemi di trasmissione dell'impulso nervoso alle fibre muscolari da parte di una sostanza potenzialmente tossica, la tossina botulinica.

La tossina botulinica, comunemente riferita Botulino, è prodotta da un batterio, il *Clostridium Botulinum* causa di infezioni che possono provocare anche la morte di un individuo per paralisi dei muscoli respiratori a seguito dell'arresto della liberazione dell'acetilcolina a livello delle terminazioni nervose sulla muscolatura e conseguente blocco della trasmissione dell'impulso nervoso alla membrana muscolare.

La scoperta del suo meccanismo d'azione ha trasformato questa tossina in un farmaco capace di alleviare, da circa 20 anni, molte situazioni patologiche quali: strabismo congenito, blefarospasmo, spasmi agli arti, incontinenza grave.

A partire dal 1992 un dermatologo canadese ebbe l'idea di utilizzare la tossina botulinica in campo cosmetico al fine di distendere le rughe glabellari, cioè le rughe verticali poste tra le sopracciglia. Questa

idea ha trovato sempre maggiori applicazioni in campo non terapeutico ma è solo nel 2002 che l'FDA ha approvato la sua applicazione per fini puramente estetici. Iniettata a piccole dosi tramite microiniezioni cutanee nelle rughe d'espressione dai chirurghi estetici e dai dermatologi, distende le rughe perché decontrae i muscoli. In Italia l'approvazione è dell'aprile 2004, ad uso esclusivo di chirurghi plastici, maxillo-facciali, dermatologi e oftalmologi.

L'uso della Tossina Botulinica a fini estetici, tramite microiniezioni cutanee, viene previsto principalmente per distendere le rughe d'espressione verticali della fronte, tra le sopracciglia. In generale però l'uso è stato esteso a tutto il terzo superiore del viso (fronte, glabella, occhi).

I trattamenti con la tossina botulinica pur avendo rivoluzionato l'approccio cosmetico del trattamento delle rughe facciali non sono però scevri dal presentare inconvenienti, anche gravi, di utilizzo.

Sono infatti ampiamente conosciuti e documentati nella letteratura scientifica, i possibili rischi collegati alle iniezioni della tossina Botulinica a fini estetici, quali dolore nella parte trattata, eritema, nausea, gonfiore. Una quantità eccessiva può inoltre causare fissità d'espressione mentre un errore nell'inoculo può determinare l'abbassamento del sopracciglio o delle palpebre.

Alla luce di quanto sopra esposto, risulta evidente l'esigenza di potere disporre di prodotti cosmetici per distendere le rughe d'espressione, quindi tramite un'applicazione topica e perciò non invasiva, che consentano di ridurre i rischi insiti in questi metodi di trattamento estetici.

Uno scopo della presente invenzione consiste nel fornire una composizione ed un metodo cosmetico in grado di determinare una effi-

efficace distensione delle rughe d'espressione senza ricorrere ad una via di somministrazione cruenta (microiniezione) dei principi attivi..

Un altro scopo dell'invenzione consiste nel fornire una composizione cosmetica in grado di distendere le rughe d'espressione senza determinare l'insorgenza di effetti collaterali tipici dell'applicazione locale di botulino.

Ancora un altro scopo dell'invenzione consiste nel fornire una composizione cosmetica priva di tossina botulinica che sia in grado di ridurre le micro-contrazioni cutanee del viso producendo un effetto di distensione delle rughe d'espressione determinando la loro attenuazione o scomparsa.

Gli scopi secondo la presente invenzione vengono raggiunti realizzando una composizione ad uso cosmetico come esposto nella rivendicazione 1. Ulteriori caratteristiche dell'invenzione sono evidenziate dalle rivendicazioni successive.

La presente invenzione origina dalla constatazione che combinando una selezionata componente peptidica provvista di azione decontratturante o di rilassamento sulla fibra muscolare con un microelemento che riduce il livello di contrazione muscolare agendo direttamente o indirettamente su un componente della fibra muscolare, si ottiene un'azione sinergica di distensione delle rughe. Questa azione di distensione è particolarmente evidente a livello delle rughe d'espressione.

In accordo ad un primo aspetto dell'invenzione viene quindi fornita una composizione cosmetica a base di principi attivi che agendo tramite meccanismi diretti e/o indiretti su diversi siti d'azione a livello della cellula o fibra muscolare, producono un'azione sinergica di rilassamento sulla fibra stessa che determina una distensione della ruga d'espressione particolarmente apprezzabile da un punto di vista estetico.

La Richiedente ha individuato, in accordo ad un primo aspetto dell'invenzione, che l'azione sinergica di distensione sulle rughe è particolarmente marcata quando la componente peptidica attiva della composizione comprende un pentapeptide contenente i seguenti amino acidi: alanina (ala), arginina (arg), prolina (pro), glicina (gly).

Secondo una forma di realizzazione preferita detta componente peptidica è composta da 5 aminoacidi ad attività curaro-simile e preferibilmente prevede la seguente sequenza: GLY-PRO-ARG-PRO-ALA.

A livello della sinapsi, il pentapeptide GLY-PRO-ARG-PRO-ALA compete con il neurotrasmettitore acetilcolina nel legame al suo recettore, il quale è presente al livello della membrana della cellula muscolare e ha una struttura a forma di canale. Generalmente questi recettori canale sono chiusi, e tali rimangono fin tanto che alcune molecole di acetilcolina non si legano ad essi portandone all'apertura. In seguito al legame di detto peptapeptide al posto dell'acetilcolina, i canali rimangono chiusi, per cui non si ha il passaggio degli ioni positivi (gli ioni sodio Na⁺) all'interno della cellula muscolare, necessari affinché si realizzi la depolarizzazione della membrana e di conseguenza non si verifica la contrazione muscolare a causa del mancato accumulo degli ioni calcio.

Tipicamente, un pentapeptide del tipo gly-pro-arg-pro-ala-NH₂ particolarmente idoneo nell'applicazione dell'invenzione, può essere ottenuto mediante un processo di sintesi chimica in fase solida. Secondo questa modalità di sintesi il pentapeptide viene sintetizzato utilizzando un supporto solido polimerico, quale ad esempio la resina clorotritilcloruro-2 cui vengono legati in successione gli amminoacidi, partendo dal primo. Quest'ultimo può essere utilizzato in forma opportunamente modificata

affinché si leghi alla resina e resti protetto (Fmoc-protection) dall'azione dei reagenti utilizzati durante la sintesi del polipeptide.

Convenientemente segue una o più serie di fasi di purificazione, tipicamente mediante cromatografia a scambio ionico e cromatografia su gel che portano all'ottenimento dell'oligopeptide purificato.

In accordo ad una forma di realizzazione, la componente peptidica attiva della composizione dell'invenzione comprende un pentapeptide di gly-pro-arg-pro-ala-NH₂, associato con un dipeptide ad azione decontratturante o rilassante la fibra muscolare, convenientemente comprendente gli aminoacidi tirosina ed arginina che interviene nei processi di neurotrasmissione determinando una decontrazione della fibra muscolare e la conseguente distensione della stessa muscolatura.

In particolare, detto dipeptide di tirosina arginina:

- nei neuroni del sistema nervoso centrale (SNC), stimola l'espressione genica del gene POMC (Pro-opiomelanocortina) precursore della met-enkefalina, neuropeptide coinvolto nel rilassamento della muscolatura;
- riduce la sintesi di CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide), neuropeptide coinvolto nella stimolazione dell'attività muscolare. Infatti mentre da una parte l'acetilcolina produce una contrazione delle fibre muscolari, dall'altra il CGRP stimola la produzione di AMP ciclico che, attraverso una serie di fosforilazioni a catena, rinforza il tono della contrazione e attiva la produzione di energia nella cellula muscolare.

Secondo una forma di realizzazione, il dipeptide tirosina-arginina viene acetilato allo scopo di renderlo maggiormente lipofilo, più stabile e biodisponibile a livello cutaneo. Particolarmente idoneo all'applicazione cutanea e cosmetica è l'acetil tirosina-arginina-1 cetil estere, una forma in grado di modulare in maniera efficiente il rilascio di neuromediatrici.

In accordo ad un'altra forma di realizzazione la composizione cosmetica comprende un'associazione di una o entrambe le componenti penta/di peptidica precedentemente descritte con un microelemento che riduce il livello di contrazione muscolare.

Nell'ambito dell'invenzione, con il termine di microelemento si intendono elementi inorganici fisiologicamente accettabili che svolgono un'azione o possono intervenire a livello della conduzione dello stimolo nervoso alle fibre muscolari. Microelementi idonei nell'ambito dell'invenzione comprendono uno o più tra sodio, potassio, magnesio, loro sali e derivati fisiologicamente accettabili.

La presenza contemporanea dei microelementi sodio, potassio e magnesio, risulta particolarmente vantaggiosa poiché agendo con meccanismi diversi, questi microelementi determinano la chiusura di due punti di accesso della cellula muscolare limitando in questo considerevolmente la fuoriuscita di ioni calcio e impedendo il meccanismo di contrazione muscolare.

Si è riscontrato nei test in vitro che la somministrazione a livello delle sinapsi neuro-muscolari di un'associazione di sodio e potassio determina un'azione miorilassante e che si traduce in una conseguente distensione delle rughe di espressione.

In questo ambito la Richiedente ha ulteriormente individuato nell'estratto a base acquosa d'anice una fonte naturale ricca proprio in sali di sodio e soprattutto potassio. Il suo meccanismo d'azione di tipo miorilassante è specificatamente legato al potassio che blocca la pompa sodio-potassio presente a livello della membrana della cellula muscolare, impedendo così la depolarizzazione della membrana stessa e l'apertura dei canali del calcio situati a livello del reticolo endoplasmatico della cellula muscolare. Il mancato accumulo di tali ioni calcio nella cellula fa

sì che le miofibrille contenute all'interno della cellula muscolare non si contraggono evitando così la contrazione dell'intero muscolo.

L'estratto d'anice rappresenta pertanto una fonte naturale di sodio-potassio particolarmente idonea per realizzare una composizione cosmetica per combattere le rughe d'espressione.

Una idonea soluzione acquosa ricca in sali di Na^+ e K^+ viene ricavata mediante estrazione acquosa dai frutti di Pimpinella Asinum utilizzando acqua come solvente ed un rapporto materia prima / estratto pari a $\frac{1}{2}$. Il processo di estrazione tipicamente comprende le fasi di solubilizzazione dei frutti di anice in acqua, la successiva idrolisi enzimatica, la separazione delle fasi solubili e insolubili, la filtrazione e opzionalmente una filtrazione sterile finale.

Tipicamente, la presenza all'interno della composizione cosmetica dell'invenzione di magnesio e/o di suoi sali/derivati può essere altresì rilevante ai fini dell'effetto anti-rughe finale poiché questo microelemento esplica un'attività decontratturante sulla muscolatura, come dimostrato dai test in vitro realizzati.

Il Magnesio determina infatti una riduzione della concentrazione degli ioni Calcio interferendo con i canali Calcio voltaggio-dipendenti presenti a livello del reticolo endoplasmatico della cellula muscolare. Impedendo a quest'ultimi di aprirsi, il Magnesio impedisce l'uscita degli ioni Calcio stipati nel reticolo. Inibendo la loro liberazione si inibisce lo stimolo alla contrazione.

E' stato sperimentalmente dimostrato che variando in più tempi la concentrazione di ioni Magnesio, la quantità di ioni Calcio che fuoriesce dalle vescicole di reticolo endoplasmatico diminuisce all'aumentare della stessa concentrazione di Mg^{++} presenti nel medium. In particolare, e'

stata valutata la dipendenza del flusso in uscita degli ioni calcio dalla concentrazione esterna di ioni magnesio. I risultati ottenuti sono evidenziati nel grafico di figura 2.

Tra i diversi derivati del magnesio utilizzabili nell'ambito dell'invenzione, il magnesio gluconato è risultato essere particolarmente apprezzabile per l'utilizzo all'interno di una composizione cosmetica.

Secondo una forma di realizzazione particolarmente preferita la composizione cosmetica dell'invenzione comprende un'associazione di un pentapeptide di gly-pro-arg-pro-ala con un dipeptide di acetil tirosina-arginina e microelementi di sodio, potassio e magnesio gluconato. L'applicazione topica continuativa di questa composizione sulle zone del corpo in necessità di trattamento antirughe contro le rughe d'espressione induce un rilassamento dei muscoli d'espressione, come dimostrato dai test in vitro determinando, ad esempio, una riduzione della profondità delle rughe formate dalle contrazioni ripetute dei movimenti dei muscoli facciali.

In accordo ad una forma di realizzazione, la composizione dell'invenzione comprende :

- fra lo 0.001% e il 5% in peso di Sodio e Potassio
- fra lo 0.001% e il 5% di Magnesio gluconato
- fra lo 0.001% e il 5% di acetil tirosil-arginil (Dipeptide)-1 cetil Estere
- fra lo 0.001% e il 5% di gly-pro-arg-pro-ala-NH₂.

La Richiedente prevede l'utilizzo di questi principi attivi in dosaggi crescenti in funzione della gravità delle rughe che possono essere definite secondo una scala di valutazione comunque non esaustiva, come rughe moderate, rughe profonde e rughe molto profonde.

Per distendere le rughe d'espressione, i sopradetti principi attivi lavorano sinergicamente sul meccanismo di de-contrazione della cellula muscolare, secondo le seguenti diverse modalità d'azione:

- il pentapeptide di gly-pro-arg-pro-ala-NH₂, agisce principalmente sulla membrana post-sinaptica. Detto pentapeptide è un antagonista competitivo dei recettori di membrana per l'acetilcolina (Ach). Quando i recettori di membrana per l'acetilcolina sono bloccati, i canali ionici rimangono chiusi. Gli ioni sodio non vengono rilasciati, non viene indotta la liberazione degli ioni calcio ed il muscolo resta rilassato, con conseguente distendimento dei tessuti superficiali ed appianamento delle rughe.
- L'associazione sodio e potassio ha la proprietà di agire sulle pompe sodio-potassio presenti a livello della membrana della cellula muscolare bloccandole e impedendo per conseguenza l'apertura dei canali del calcio. Il mancato accumulo di ioni calcio nella cellula muscolare fa sì che la contrazione non possa avvenire.
- Il magnesio è un antagonista del calcio e ne inibisce la liberazione da parte dei canali calcio voltaggio-dipendenti presenti sul reticolo endoplasmatico della cellula muscolare. Inibendo la loro liberazione si inibisce lo stimolo alla contrazione.
- l'acetil dipeptide di tirosina-arginina 1 cetil estere stimola la sintesi dei neuropeptidi messaggeri di rilassamento muscolare e inibisce la sintesi dei mediatori messaggeri della contrazione muscolare.

Dalla combinazione dei questi diversi meccanismi d'azione, illustrati nell'allegata Figura 3, si estrinseca l'attività sinergica decontratturante dei muscoli facciali di una forma di realizzazione preferita del preparato oggetto dell'invenzione.

Le composizioni o i preparati cosmetici dell'invenzione sono forniti sotto una qualsiasi forma idonea all'applicazione cutanea, quali creme, emulsioni, lozioni, gel, oli, paste, unguenti, spray ecc. per ostacolare e ridurre le microcontrazioni cutanee con l'effetto finale di distendere le rughe d'espressione.

Per la preparazione delle composizioni cosmetiche si utilizzano le apparecchiature messe attualmente a disposizione della tecnologia secondo modalità consuete per gli esperti del ramo.

Uno o più dei principi attivi sono aggiunti e dispersi all'interno di un veicolo fisiologicamente accettabile secondo modalità note agli esperti, convenientemente aggiungendo uno o più sostanze additive quali stabilizzanti, emulsionanti, eccipienti, conservanti, profumi e sospendenti.

Per potenziarne l'attività e veicolare con una migliore performance attraverso la cute, detti principi attivi possono essere racchiusi in un trasportatore o veicolo comprendente liposomi che li rilasciano gradualmente nel sito d'azione. L'utilizzo dei liposomi ha lo scopo di agevolare la penetrazione dei principi attivi fino al sito d'azione. I liposomi utilizzati sono preferibilmente del tipo multilamellare e convenientemente hanno dimensioni comprese tra 150-500 nm. Le particelle hanno generalmente più di 5 lamelle e i loro anelli concentrici sono lentamente degradanti; essi rilasciano gradualmente il loro contenuto che diffonde all'esterno man mano che la concentrazione nella fase esterna diminuisce. L'alto numero di lamelle consente una migliore ritenzione delle molecole idrosolubili rispetto ad altri tipi di vescicole.

In particolare, i liposomi utilizzati nel preparato/composizione oggetto dell'invenzione sono del tipo *pro-liposomi*, ovvero liposomi che si formano durante le fasi di lavorazione del preparato. Convenientemente,

Convenientemente, i fosfolipidi vengono forniti sotto forma di bilayers ammassati disordinatamente e la formazione dei liposomi è innescata dall'aggiunta, sotto agitazione, di un' idonea quantità di acqua in eccesso alla miscela di principi attivi.

L'applicazione del trovato cosmetico sulla cute del viso può essere effettuata direttamente tramite le dita e/o attraverso una metodica, già sottoposta a domanda di brevetto, che consente la stesura del preparato stesso direttamente sul solco della ruga tramite un applicatore di precisione a siringa graduata, dotato di cannula per applicazione esterna ad estremità tronca. Questo apparecchio di applicazione (domanda di brevetto svizzera N°. 01714/04) rappresenta, per la precisione di applicazione del preparato cosmetico, una innovazione poiché consente di applicare il preparato direttamente sul solco delle rughe in maniera precisa, migliorando anche l'efficacia del trovato stesso, oggetto del presente brevetto.

E' altresì possibile che i principi attivi siano anche liberamente dispersi in un preparato cosmetico e tale utilizzo è preferibilmente, ma non esclusivamente, realizzato in prodotti di proseguimento finalizzati ad essere distribuiti liberamente sulla cute del viso, anziché sul solco della ruga.

I seguenti esempi sono forniti a mero scopo illustrativo della presente invenzione e non devono essere intesi in senso limitativo dell'ambito di protezione, come risulta dalle accluse rivendicazioni.

ESEMPIO 1

Formulazione di una composizione cosmetica secondo l'invenzione, con liposomi, idonea come preparato di attacco e denominata Botoina® per applicazioni transcutanee:

- 1% in peso di pentapeptide di gly-pro-arg-pro-ala-NH₂
- 4% in peso di estratto di anice
- 1% di Magnesio gluconato
- 2% di acetil tirosil-arginil (Dipeptide)-1 cetil Estere
- 6- 8% paraffina liquida
- 5-7% poliisoprene
- 0,1-1% alcool stearilico 25-etossilato
- 1-2% coccopolipeptide di grano
- 1-2% Proteine di grano esterificate con acido palmitico
- 1-3% gliceril isostearato
- 1-3% glicole propilenico
- 0-1% olio lanolina
- 0-1% dimeticone
- 0,1-1% lecitina
- 0,001-0,1% glicerina
- alcol 0,001-0,1%
- conservanti/antiossidanti quanto basta
- profumo
- acqua quanto basta a 100

ESEMPIO 2

Formulazione di una composizione cosmetica secondo l'invenzione idonea come preparato cosmetico di proseguimento:

- 0,5% in peso di pentapeptide di gly-pro-arg-pro-ala-NH₂
- 1% in peso di estratto di anice
- 0,5% di Magnesio gluconato
- 1% di acetil tirosil-arginil (Dipeptide)-1 cetil Estere
- 5- 7% paraffina liquida

- 5-7% poliisoprene
- 0,1-1% alcool stearilico 25- etossilato
- 1-2% coccopolipeptide di grano
- 1-2% Proteine di grano esterificate con acido palmitico
- 1-3% gliceril isostearato
- 1-3% glicole propilenico
- 2-3% alcool isostearilico
- 0-1% olio lanolina
- 0-1% pantenolo
- conservanti/antiossidanti quanto basta
- profumo
- acqua quanto basta a 100

ESEMPIO 3

Formulazione di una composizione cosmetica secondo l'invenzione idonea come preparato cosmetico di mantenimento:

- 0,3% in peso di pentapeptide di gly-pro-arg-pro-ala-NH₂
- 0,5% in peso di estratto di anice
- 0,3% di Magnesio gluconato
- 0,5% di acetil tirosil-arginil (Dipeptide)-1 cetil Estere
- 6% paraffina liquida
- 5% poliisoprene
- 0,5% alcool stearilico 25-etossilato
- 2% coccopolipeptide di grano
- 2% Proteine di grano esterificate con acido palmitico
- 2% gliceril isostearato
- 1% glicole propilenico
- 3% alcool isostearilico

- 0,5% olio lanolina
- 0,5% dimeticone
- profumo
- conservanti / antiossidanti q.b.
- acqua quanto basta a 100

ESEMPIO 4

Per valutare l'efficacia del preparato oggetto dell'esempio 1 è stato eseguito un test di autovalutazione da parte di un campione di 40 donne di età compresa tra 35 e 65 anni.

Le volontarie hanno applicato il preparato d'attacco alle rughe per 20 giorni, tramite l'utilizzo dell'applicatore a siringa con cannula ad estremità tronca.

Il campione di donne era così composto:

- 16 donne di età compresa tra 35 e 45 anni
- 12 donne di età compresa tra 46 e 55 anni
- 12 donne di età compresa tra 56 e 65 anni

Il preparato è stato applicato nella misura di un millilitro precisamente nel solco delle rughe frontali, glabellari, contorno occhi, naso-labiali e contorno labbra. Lasciato agire per 10 minuti è stato poi massaggiato con la punta delle dita fino ad assorbimento.

Le volontarie hanno espresso un'autovalutazione sullo stato delle proprie rughe d'espressione e della pelle in generale a conclusione dei 20 giorni di trattamento, rispondendo ad un questionario.

Alla domanda: "Ha notato una diminuzione delle rughe d'espressione?" i risultati sono stati i seguenti:

- Il 75% delle volontarie (30 donne su 40) hanno dichiarato di avere notato una diminuzione delle rughe d'espressione.

- Nel campione composto da 16 donne di età compresa tra 35 e 45 anni l'87,5% (14 donne su 16) hanno dichiarato di avere notato una diminuzione delle rughe d'espressione.
- Nel campione composto da 12 donne di età compresa tra 46 e 55 anni il 58,3% (7 donne su 12) hanno dichiarato di avere notato una diminuzione delle rughe d'espressione.
- Nel campione composto da 12 donne di età compresa tra 56 e 65 anni il 75% (9 donne su 12) hanno dichiarato di avere notato una diminuzione delle rughe d'espressione.

Alla domanda "Ha notato, dopo 20 giorni, un miglioramento della pelle come levigatezza e distensione delle rughe?" i risultati sono stati i seguenti:

- L'80% delle volontarie (32 donne su 40) hanno dichiarato di avere notato un miglioramento della pelle.
- Nel campione composto da 16 donne di età compresa tra 35 e 45 anni il 62,5% (10 donne su 16) hanno dichiarato di avere notato un miglioramento della pelle.
- Nel campione composto da 12 donne di età compresa tra 46 e 55 anni l'83,3% (10 donne su 12) hanno dichiarato di avere notato un miglioramento.
- Nel campione composto da 12 donne di età compresa tra 56 e 65 anni il 100% delle donne hanno dichiarato di avere notato un miglioramento della pelle.

E' stato inoltre chiesto un parere circa l'utilità della particolare modalità di applicazione ai fini della diminuzione delle rughe. Alla domanda "Trova che la modalità di applicazione del preparato sul solco della ruga con siringa e cannula sia utile per ottenere una diminuzione delle rughe?" i risultati sono stati i seguenti:

- Il 92% delle volontarie (37 donne su 40) hanno risposto SI.
- Nel campione composto da 16 donne di età compresa tra 35 e 45 anni l'87,5% (14 donne su 16) hanno risposto SI.
- Nel campione composto da 12 donne di età compresa tra 46 e 55 anni, il 100% hanno risposto SI.
- Nel campione composto da 12 donne di età compresa tra 56 e 65 anni, il 91,7% delle donne (11 donne su 12) hanno risposto SI.

ESEMPIO 5

Test di efficacia in vitro su pentapeptide

E' stata determinata la frequenza delle contrazioni in un modello di co-coltura nervo-muscolo per valutare la capacità decontratturante del pentapeptide gly-pro-arg-pro-ala-NH₂, utilizzato ad una concentrazione dello 0,3% in peso.

Dopo 1 minuto e dopo 2 ore di incubazione con l'attivo in esame sono state contate le contrazioni verificatesi nell'arco di 30 sec.

Con l'uso di 0,3% di detto pentapeptide le riduzioni della frequenza delle contrazioni sono state le seguenti:

- Dopo 1 minuto la riduzione media della frequenza di contrazione è stata del 69,75%
- Dopo 2 ore la riduzione media della frequenza di contrazione è stata del 60,75%.

I dati ottenuti sono riassunti nel grafico illustrato nell'allegata figura 4.

ESEMPIO 6

E' stata valutata l'attività dei due microelementi sodio e potassio in associazione per l'applicazione cosmetica.

Test di efficacia in vitro

E' stata determinata l'entità della contrazione in un modello nervo-muscolo per valutare la capacità decontraente dell'associazione Sodium-Potassium all'1, 2, 3 %. Sono state contate le contrazioni verificatesi

nell'arco di 30 sec. prima dell'inizio del trattamento stesso e dopo 20 min. di contatto della co-cultura con l'attivo in esame.

L'associazione Sodio-Potassio dimostra attività miorilassante riducendo le contrazioni muscolari nella seguente misura:

Sodio-Potassio 1% : -27%

Sodio-Potassio 2% : -86%

Sodio-Potassio 3% : -100%

Questi risultati sono riassunti nel grafico illustrato in Figura 1

Test di efficacia in vivo

E' stata valutata la riduzione della superficie, della lunghezza e del numero delle rughe a zampa di gallina, delle rughe glabellari e naso-labiali in 20, 19, 20 volontarie rispettivamente. Queste hanno applicato due volte al giorno e per 28 giorni un'emulsione contenente Sodium-Potassium al 4%. Al termine dei 28 giorni sono stati riscontrati i seguenti risultati:

Rughe a zampa di gallina:

riduzione superficie totale: -40%

riduzione lunghezza totale: -34%

riduzione numero totale: -13%

Miglioramenti osservati nell'85% delle volontarie.

Rughe glabellari:

riduzione superficie totale: -20%

riduzione lunghezza totale: -21%

riduzione numero totale: -18%

Miglioramenti osservati nel 68% delle volontarie.

Rughe nasolabiali:

riduzione superficie totale: -22%

riduzione lunghezza totale: -20%

riduzione numero totale: -17%

Miglioramenti osservati nel 65% delle volontarie.

ESEMPIO 7

E' stata valutata l'efficacia decontratturante del dipeptide N-acetil tiro-sil-arginil (Dipeptide) esadecil estere, solubilizzato in un eccipiente idroglicolico.

Test di efficacia in vitro

1. Valutazione dell'espressione genica del gene POMC (neuromediatore del rilassamento) in una coltura di cheratinociti umani incubati per 24h in presenza dell'acetil dipeptide a 0,4 %, 0,9 % e 1,9 %. Rispetto al controllo, la maggiore sovraespressione del gene in esame è risultata essere:
 - acetil Dipeptide-1 cetil estere 0,9 % > + 29%
 - acetil Dipeptide-1 cetil estere 1,9 % > + 63%
2. Valutazione della sintesi di CGRP (neuromediatore della contrazione) in una coltura di neuroni incubati per 6 ore in presenza di acetil dipeptide a 2,8 % e 4,7 %. Rispetto al controllo si osserva la riduzione della sintesi di CGRP dopo l'incubazione con il dipeptide pari a:
 - acetil Dipeptide-1 cetil estere 2,8 % : -0 %
 - acetil Dipeptide-1 cetil estere 4,7 % : -50 %
3. Valutazione della frequenza delle contrazioni in un modello di co-coltura nervi-muscoli in incubazione con acetil Dipeptide-1 cetil estere allo 0,9 % per 5 min e 2h. La contrazione delle 3 fibre muscolari sottoposte a controllo diminuisce nel seguente modo:
 - dopo 5 min. di incubazione con acetil Dipeptide-1 cetil estere 1 fibra su 3 manifesta un'inibizione della contrazione superiore al 20%

- dopo 2 ore di incubazione con acetil Dipeptide-1 cetil estere tutte e 3 le fibre manifestano un'inibizione della contrazione del 100%

I risultati ottenuti sono riassunti nella seguente Tabella

**DIMINUIZIONE DELLA CONTRAZIONE DELLA FIBRA
MUSCOLARE**

	Controllo Negativo	Controllo Positivo (α -bungarotossina)	Acetyl Dipeptide-1 Cetyl Ester (0,9%)	
			dopo 5 min	dopo 2 ore
Fibra 1	0	blocco	> 20%	blocco
Fibra 2	0	blocco	< 20%	blocco
Fibra 3	0	blocco	< 20%	blocco

RIVENDICAZIONI

1. Composizione cosmetica idonea a distendere le rughe di espressione comprendente almeno un peptide ad azione decontratturante sulla fibra muscolare in associazione con almeno un microelemento che riduce la contrazione di una fibra muscolare ed un veicolo cosmeticamente accettabile in cui detto peptide è scelto tra un pentapeptide, un dipeptide e loro miscele.
2. Composizione secondo la rivendicazione 1 in cui detto pentapeptide comprende i seguenti aminoacidi alanina (ala), arginina (arg), prolina (pro), glicina (gly).
3. Composizione secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui detto pentapeptide ha la sequenza GLY-PRO-ARG-PRO-ALA.
4. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3 in cui detto dipeptide comprende gli aminoacidi tirosina- arginina.
5. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4 in cui detto dipeptide è acetilato per renderlo maggiormente lipofilo.
6. Composizione secondo la rivendicazione 5, in cui detto dipeptide acetilato è acetil tirosina-arginina-1 cetil estere.
7. Composizione secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni 1-6 in cui detto almeno un peptide comprende un pentapeptide di gly-pro-arg-pro-ala-NH₂ ed un dipeptide di tirosina-arginina.
8. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 - 7, in cui detto microelemento è scelto tra sodio, potassio, magnesio, loro sali e/o derivati fisiologicamente accettabili e loro miscele.

9. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8 in cui l'associazione di microelementi di sodio-potassio viene fornita in forma di estratto acquoso d'anice.
10. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-9 in cui detto microelemento comprende magnesio gluconato.
11. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10 in cui detto microelemento è un'associazione di sodio, potassio e magnesio gluconato.
12. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-11 comprendente un pentapeptide di gly-pro-arg-pro-ala-NH₂, un dipeptide di acetil tirosina-arginina-1 cetil estere, sodio, potassio, magnesio gluconato ed un veicolo cosmeticamente accettabile.
13. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-12, comprendente fra lo 0.001% e il 5% in peso di sodio e potassio, fra lo 0.001% e il 5% in peso di magnesio gluconato, fra lo 0.001% e il 5% in peso di acetil tirosil-arginil -1 cetil estere e fra lo 0.001% e il 5% di pentapeptide di gly-pro-arg-pro-ala-NH₂.
14. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1- 13 in forma di una crema cosmetica per l'applicazione cutanea.
15. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-14 in cui detto veicolo comprende liposomi.
16. Composizione secondo la rivendicazione 15 in cui detti liposomi sono di tipo multilamellare.
17. Composizione secondo la rivendicazione 15 o 16 in cui detti liposomi hanno una dimensione compresa tra 150-500 nm.

18. Metodo di trattamento cosmetico per la distensione delle rughe comprendente l'applicazione sulla cute in necessità di trattamento di un quantitativo cosmeticamente efficace di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 17.

19. Metodo secondo la rivendicazione 18 comprendente l'applicazione della composizione cosmetica direttamente sul solco della ruga tramite un applicatore di precisione a siringa graduata, dotato di cannula per applicazione esterna ad estremità tronca.

20. Metodo secondo la rivendicazione 18 o 19 in cui dette rughe sono rughe di espressione.

Titolo: "Composizione cosmetica per l'applicazione cutanea idonea a distendere le rughe d'espressione."

RIASSUNTO

La presente invenzione si riferisce ad una composizione cosmetica per l'applicazione cutanea idonea a distendere le rughe d'espressione che associa una selezionata componente peptidica attiva provvista di azione decontratturante o di rilassamento sulla fibra muscolare con un microelemento che riduce il livello di contrazione muscolare agendo direttamente o indirettamente su un componente della fibra muscolare. Convenientemente, i principi attivi della composizione cosmetica dell'invenzione sono veicolati da liposomi.

Fig. 1

**DIMINUZIONE PERCENTUALE DELLA FREQUENZA DI
CONTRAZIONE**

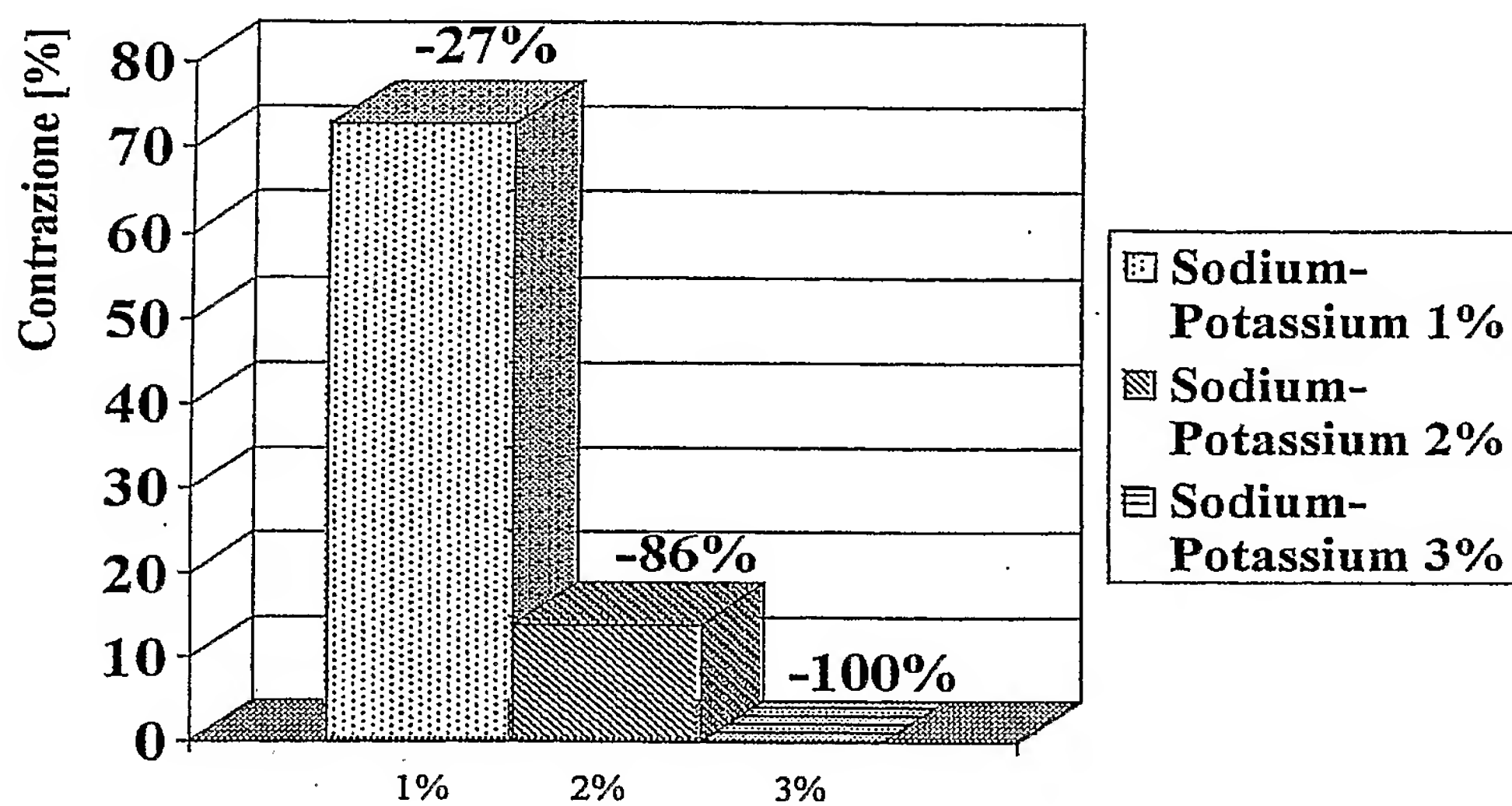
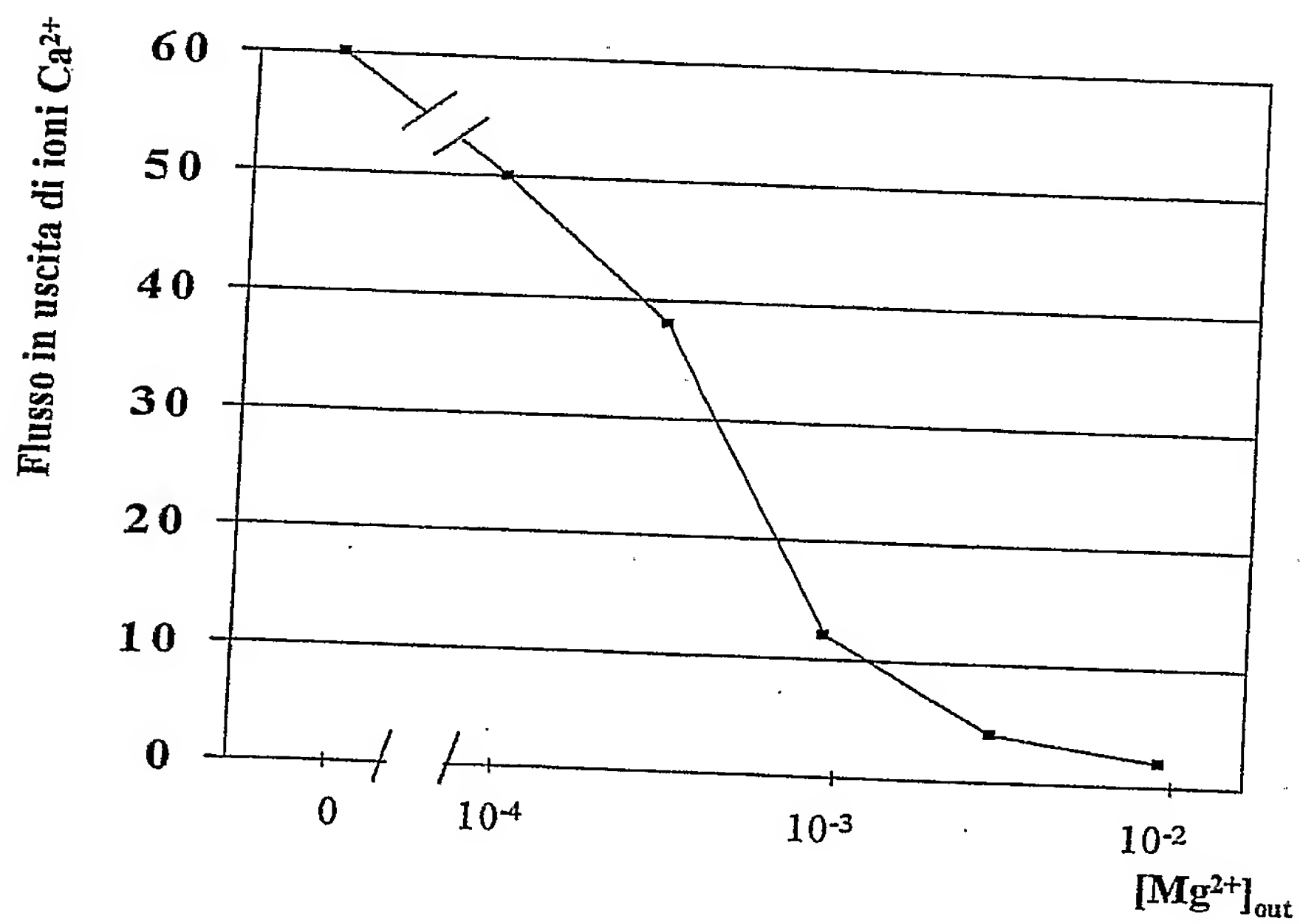


FIG. 2

DIPENDENZA DEL FLUSSO IN USCITA DEGLI IONI CALCIO
DALLA CONCENTRAZIONE ESTERNA DI IONI MAGNESIO



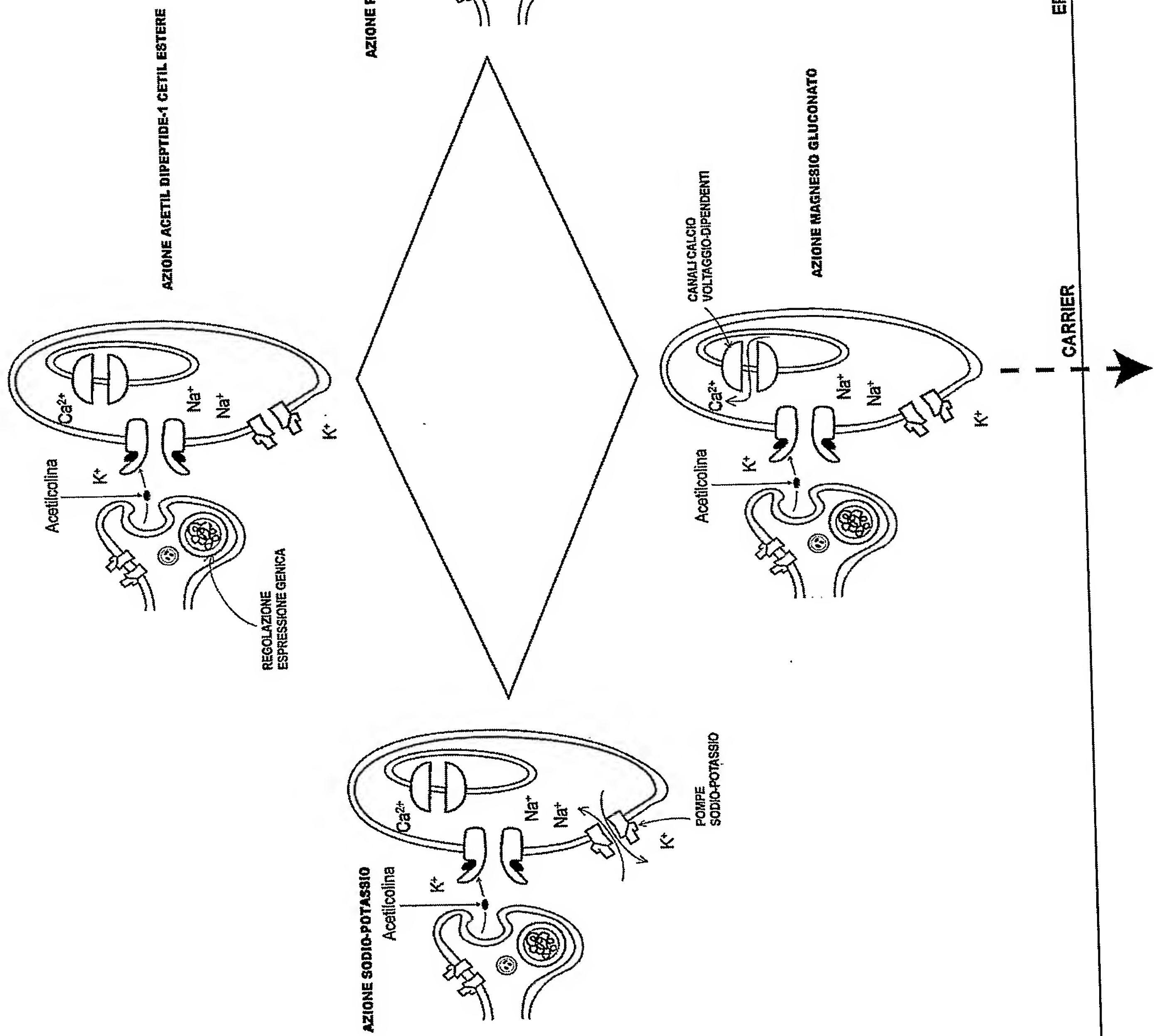


Fig. 3

FIG. 4

